

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 03-164177

(43)Date of publication of application : 16.07.1991

(51)Int.Cl.

C12N 11/08
G01N 27/327

(21)Application number : 01-083262

(71)Applicant : NAGOYASHI

(22)Date of filing : 31.03.1989

(72)Inventor : ITO NOBUYOSHI
KATO HISAO
KOJIMA MASAHIKO
MORINAGA SHIGEYOKI

(54) ENZYME-IMMOBILIZING CARRIER FOR BIOLOGICAL SENSOR

(57)Abstract:

PURPOSE: To obtain the title carrier reduced in elution of enzyme, having excellent protein-immobilizing properties, capable of immobilizing high-concentration enzyme and suitable for electrode type biosensor, etc., by using a polyallylamine as an essential constituent material.

CONSTITUTION: The objective carrier obtained by immobilizing an enzyme on a carrier in which polyallylamine is used as essential constituent material and preferably containing a water soluble polymer with glutaric aldehyde. Furthermore, polyvinylpyrrolidone, etc., is preferably used as the water soluble polymer and polyallylamine is preferably used at an amount of 20 pts.wt. based on 100 pts.wt. base polymer.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

⑩ 日本国特許庁(JP)

⑪ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A) 平3-164177

⑬ Int.Cl.⁹

C 12 N 11/08
G 01 N 27/327

識別記号

A

庁内整理番号

2121-4B

⑭ 公開 平成3年(1991)7月16日

7235-2G G 01 N 27/30 3 5 3 P

審査請求 未請求 請求項の数 1 (全5頁)

⑮ 発明の名称 バイオセンサ用酵素固定化担体

⑯ 特 願 平1-83262

⑰ 出 願 平1(1989)3月31日

特許法第30条第1項適用 昭和63年10月4日、電子情報通信学会信越支部発行の「昭和63年度電子情報通信学会信越支部大会講演論文集」に発表

⑱ 発 明 者	伊 藤	信 義	愛知県名古屋市北区志賀町4丁目75
⑱ 発 明 者	加 藤	久 雄	愛知県名古屋市市中村区靖国町1-128
⑱ 発 明 者	小 島	雅 彦	愛知県名古屋市北区上飯田北町4-75-3 上飯田第2団地2-411
⑱ 発 明 者	森 永	重 代 記	愛知県一宮市大字光明寺字神明前91 光明寺団地59
⑲ 出 願 人	名 古 屋 市 長		愛知県名古屋市中区三の丸3丁目1番1号
⑳ 代 理 人	今 井	敦 夫	

明 細 書

1. 発 明 の 名 称

バイオセンサ用酵素固定化担体

2. 特 許 請 求 の 範 囲

ポリアリルアミン(PAA)を必須の構成材料として用い、好ましくは水溶性ポリマーを加えた担体に酵素をグルタルアルデヒドで固定化することによって酵素の溶出が少ないことを特徴とするバイオセンサ用酵素固定化担体

3. 発 明 の 詳 細 な 説 明

(産業上の利用分野)

本発明は酵素等の蛋白質の固定化担体に関するものである。その担体は優れた蛋白質固定化性を持ち、高濃度の酵素を固定化して電極型バイオセンサやイオン感敏性電界効果トランジスタ(IEET)型バイオセンサ等の用途に適している。ま

た、アフィニティクロマトグラフ等々の用途にも適している。

(従来の技術)

バイオセンサ用の酵素膜は繰返し使用する間に酵素が溶出してはいけな。酵素固定化法については、すでに、包括法、共有結合法、架橋法、イオン結合法、吸着法等などいろいろの方法が知られている。バイオセンサ用としてよく使われている代表的な酵素固定化担体として、例えば、アルブミン-グルタルアルデヒド系担体であるとか、水溶性のポリビニルアルコール(PVA)系スチルベン-感光性樹脂(Eosbb)担体、ポリビニルピロリドン(PVP)-ジアジド化合物系担体、ポリアクリルアミド-光重合用ビニルモノマー系担体などが知られている。他に、酵素を担体に吸着させただけのメンブランフィルター担体があるし、加水分解ナイロン-グルタルアルデヒド系担体等がある。

(発明が解決しようとする課題)

従来の固定化担体は、酵素を高濃度に固定出来なかったり、固定化されている酵素が溶出し易かったり、脆くて物性的に劣っていたりする。

例えば、HosbQ感光性樹脂でも酵素を10%以上加えれば、溶出すると言われている。アルブミン-グルタルアルデヒドでも酵素を約40%も入れると溶出を起こす。その他、生体ポリマーのアルブミンやゼラチンは、生成フィルムが脆かったり、品質にばらつきがあったりすると言われている。

また、感光性樹脂を使う場合には、光硬化性を与えるため特殊な官能基を持つ化合物や特殊な官能基を持つポリマーが必要である。

(課題を解決する手段)

本発明では、PAA#100%単独で用いてもよいが、ごく普通に用いられる安価で安定した品質と優れた性能とを持つ水溶性合成ポリマー、例えば、ポリビニルピロリドン(PVP)、ポリビニルアル

デヒドとシッフ塩基を作って結合する。

従って、PAA#はグルタルアルデヒドとの組合わせで担体の架橋剤にもなるし、酵素の固定化剤にもなる。

(効果)

本発明の担体は、ベースポリマーにPAA#を20%添加した場合でもアルブミン等の生体ポリマーと比べて一般アミンの濃度は十分高い。そのため、酵素濃度が高くても酵素をPAA#側鎖アミンに結合させることが可能であり、酵素膜から酵素が溶出し難くなる。

また、PAA#はグルタルアルデヒドと組合わせることにより担体の架橋剤にもなり、普通の水溶性合成ポリマーをベースポリマーに用いることが可能になる。従って、特殊な感光基をポリマー側鎖に導入する必要が無いし、アジド化合物やビニルモノマー、オリゴマーのような特殊な感光性化合物を添加する必要もない。

コール(PVA)等をベースポリマーとしてPAA#に混合して用いた方が好ましい。その混合割合は、ベースポリマー100部に対してPAA#を20部用いたが特に限定しない。

酵素の固定化方法は、水溶性ポリマー、PAA#、酵素をグルタルアルデヒドによって固定することであり、代表的な方法について実施例で詳細に述べる。

酵素膜はスクリーン印刷用の鈔、および、それに類する物の上に塗布したフィルム状として得ることが出来る。それを酸素電極等に取付ければバイオセンサとなる。

同様に行えば、ISFET基板の上にもフィルム状の酵素膜を得ることが出来る。

(作用)

本発明の担体に用いるPAA#は、一般アミンを側鎖に持つポリマーであり、市販品としても得られる。このポリマーの一般アミンと酵素蛋白質を構成するアミノ酸の一般アミンとはグルタルアル

(実施例)

以下に実施例を示す。ここで使用したPAA#は市販品(ポリアリルアミン塩酸塩 H; 日東紡績㈱)を用いたが、一旦、カ性ソーダで中和し、透析した後、水溶液の状態で用いた。また、酵素の代表としてGOD(23,800 Unit/g solid)を用いた。GOD酵素膜の組成と製法の一覧表を表1に示す。

No	酵素固定材	製法
1	HosbQ	風乾, UV照射
2	Alb + GA	風乾
3	HosbQ(100部)+PAA#(20部)	風乾, UV照射 GA処理
4	PVA(100部)+PAA#(20部)	風乾, GA処理
5	PVP(100部)+PAA#(20部)	風乾, GA処理
6	Gels	GA処理後 GOD溶液浸漬
7	PVP(100部)+PAA#(20部)	同上

表1. 固定材の組成と酵素膜の製法

GODは固定材固形分に対して40%添加

酵素膜の製法を実施例-1~4と比較例1~3に示す。

実施例 - 1.

下記の割合いで樹脂や酵素等を混合した均一な溶液を作る。

緩衝液 (PB 7.0)	1 ml
PAA=10%水溶液	100 mg
PVP	100 mg
GOD	50 mg

この溶液をテフロンシート上のスクリーン印刷用の厚さ85 μ mの紗の上に塗布し、風乾してフィルムを形成させた後、8%のグルタールアルデヒド溶液に室温で5分間処理することによってフィルム状の酵素膜(表1. No 5)が得られた。

実施例 - 2.

実施例 - 1のPVPをPVAに代えれば同様な酵素膜(表1. No 4)が得られた。

上記の溶液を実施例 - 1と同様に紗の上に塗布、風乾してフィルムを形成させた後、UVランプ(100W 超高圧水銀ランプ)で5分間10cmの距離でUVを照射し、引き続いて、3%グルタールアルデヒド溶液に室温で5分間処理することによって酵素膜(表1. No 3)が得られた。

比較例 - 1.

下記の割合いで均一な溶液を作る。

緩衝液 (PB 7.0)	1 ml
水溶性感光性樹脂 (HosbQ, 固形分13%)	1 g
GOD	50 mg

上記溶液を実施例 - 1と同様に紗の上に塗布、風乾後、実施例 - 4と同様にしてUVランプによってUVを照射することによって酵素膜(表1. No 1)が得られた。

実施例 - 3.

下記の割合いで均一な溶液を作る。

緩衝液 (PB 7.0)	1 ml
PAA=10%水溶液	100 mg
PVP	100 mg

上記の溶液を実施例 - 1と同様に紗の上に塗布、風乾してフィルム形成させた後、5%グルタールアルデヒドで1分間浸漬し、引き続いて、40mg/2mlのGOD溶液に浸漬することによって酵素膜付与の酵素膜(表1. No 7)が得られた。

実施例 - 4

下記の割合いで均一な溶液を作る。

緩衝液 (PB 7.0)	1 ml
水溶性感光性樹脂 (HosbQ, 固形分13%)	1 g
GOD	50 mg
PAA=10%水溶液	250 mg

比較例 - 2.

下記の割合いで均一な溶液を作る。

緩衝液 (PB 7.0)	1 ml
アルブミン(牛血清F-V)	125 mg
GOD	50 mg

上記溶液を冷蔵庫(約4℃)の中で約30分間保存して適当な粘度で実施例 - 1と同様に紗の上に塗布、風乾することによって酵素膜(表1. No 2)が得られた。

比較例 - 3.

下記の割合いの均一な溶液を作る。

緩衝液 (PB 7.0)	10 ml
ゼラチン	1 g

上記溶液を紗の上に塗布、風乾後、実施例 - 3と同様にグルタールアルデヒド、酵素液で処理す

ることによって酵素浸付与の酵素膜(表1. No 6)が得られた。

各実施例、比較例で得られた酵素膜を用いて、センサとして酵素電極(DG-50; エイブル社)を用いれば容易に酵素膜の活性、あるいは、酵素固定量が比較出来るし、酵素膜の活性変化、および、酵素の溶出を調べる事が出来る。

即ち、酵素電極にGOD 酵素膜を取付け、酵素飽和下の緩衝溶液中においてグルコース溶液を添加してゆくとGODにより酵素が消費されて、グルコース濃度と酵素膜中の酵素濃度(電流値, μA)との間で直線関係が得られる。その勾配(S ; 減少電流/グルコース濃度)は、酵素膜の見掛け上の活性、あるいは、酵素固定量に比例し、高い勾配ほど活性が高く、固定量が多い。また、測定回数毎の S の変化から最初の酵素膜活性との比が求まり($RA = S_1 / S_n$)、図1にそれを示す。

横軸に酵素膜の測定回数を示し、縦軸に活性変化を示す。測定回数1回あたりの時間は、同じで

はないが平均1時間を要しており、一つの試料について数回測定するには2~3日を要している。

PVA系感光性樹脂担体(比較例-1. 表1. No 1)では高濃度の酵素(約40%; 酵素/担体)を含むので酵素がかなり溶出している。また、アルブミン-グルタルアルデヒド担体(比較例-2. 表1. No 2)でも酵素を約40%も添加すれば溶出を起こす。

実施例-4の酵素膜(表1. No 3)は、同種類の担体である比較例-1の酵素膜(表1. No 1)と比べて酵素が溶出し難くなっており、PAAを添加した効果が現れている。本発明の担体は、時間的には2~3日ではあるがこのように酵素濃度が高くても酵素の溶出がほとんどない(No 3, 4, 5, 7)。

PAA単独でも酵素膜が得られるけれどPYPのような水溶性ペースポリマーと混合した担体の方が理由を特に述べないけれど高活性である。

実施例3で述べた酵素浸付与の酵素膜は、反応条件によって活性が異なるけれど、条件を選べば、

実施例-1の酵素膜(No 5)と同程度、または、それ以上高活性になる。比較例-3のゼラチン(表1. No 6)は、酵素が溶出し難いけれど活性がNo 7の酵素膜の約1/2以下であり、高活性な酵素膜が得られない。

出願人 名古屋市
代理人 今井 淳 夫

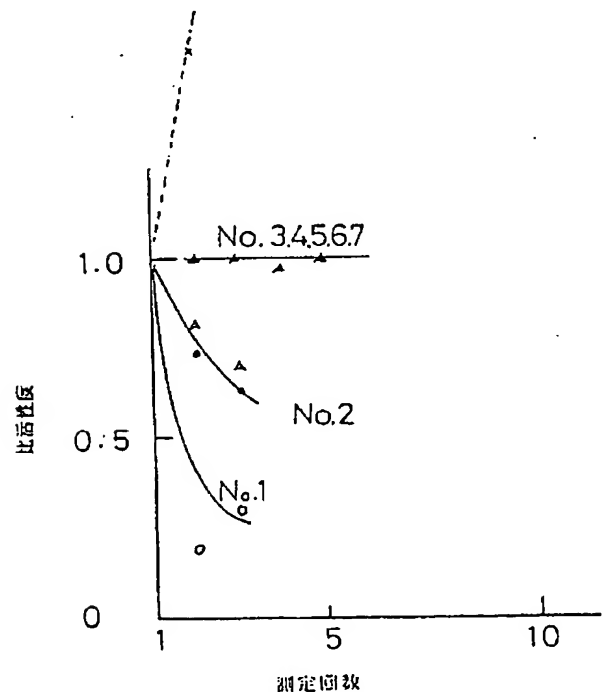


図1. 酵素膜の活性変化

特開平3-164177(5)

手続補正書(方式)



平成2年12月17日

特許庁長官 殿

4. 代理人
住所

〒456
名古屋市熱田区六番三丁目
4番41号
名古屋市工業研究所内

氏名

今井 淳 夫



1. 事件の表示

平成1年特許願第83262号

5. 補正命令の日付(発送日)

平成2年11月27日

2. 発明の名称

バイオセンサ用酵素固定化担体

6. 補正の対象

明細書の図面の簡単な説明の欄

3. 補正をする者

事件との関係

特許出願人

住所

〒460

名古屋市中区三の丸三丁目

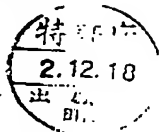
1番1号

名称

名古屋市

ニレ * フタ ニレ

市長 西 尾 武 喜



7. 補正の内容

明細書の第13頁第5行目の「…が得られない。」の後に改行して下記の記載を追加する。

記

「4. 図面の簡単な説明

第1図は本発明の実施例である各種バイオセンサ用酵素固定化担体の酵素膜の活性変化

センサ用酵素固定化担体の酵素膜の活性変化
を示すグラフである。

No.1…HosbQ

No.2…Aib + GA

No.3…HosbQ + PAA

No.4…PVA + PAA

No.5…PVP + PAA

No.6…Gela

No.7…PVP + PAA